

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-112785

(P2002-112785A)

(43) 公開日 平成14年4月16日 (2002. 4. 16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 9/00	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	4 B 0 5 0
9/00		(C 1 2 N 9/00	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-307149 (P2000-307149)

(22) 出願日 平成12年10月6日 (2000. 10. 6)

(71) 出願人 598169457

奈良先端科学技術大学院大学長

奈良県生駒市高山町8916-5

(72) 発明者 佐野 浩

奈良県生駒市鹿ノ台西2-7-15

(72) 発明者 草野 友延

奈良県奈良市富雄元町2-7-12-203

(72) 発明者 小泉 望

奈良県生駒市高山町8916-5 C505

(74) 代理人 100072051

弁理士 杉村 興作 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コーヒー属植物のテオブロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 カフェインレスコーヒーを得る為に、カフェインの生合成に関与する酵素を得る。

【解決手段】 本発明により、コーヒーアラビカにおけるテオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子を与えられた。テオブロミン合成酵素はカフェインの生合成に関与する酵素であり、当該酵素の遺伝子発現を抑制した形質転換植物を作製することにより、カフェインレスコーヒーを得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-378で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) 7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生成する活性を有し、(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項3】 以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1298で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) 7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生成する活性を有するポリペプチドをコードし、

(c)の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項4】 請求項2又は3記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオブロミンの生成量が低下した、形質転換植物。

【請求項5】 請求項4記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項6】 請求項2又は3記載の遺伝子を導入することにより、テオブロミンの生成量が増加した、形質転換植物。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項8】 請求項2又3記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオブロミンの生成量が低下した形質転換植物を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、テオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該酵素をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】コーヒーは、世界の至るところで愛好されている飲料であり、その有用性は非常に大きい。一方、コーヒーに含まれているカフェインは、コーヒーを過剰に摂取した場合に害を及ぼす原因となる物質である。カフェインはキサンチン誘導体の一種であり、キサンチン誘導体にはカフェインの他にテオフィリン、テオブロミンが含まれる。これらキサンチン誘導体は、ホスホジエステラーゼを阻害してcAMP量を増加させる事により、中枢興奮作用及び循環機能の亢進作用を有する事が知られている。キサンチン誘導体が有するこのような作用は、適量の摂取では精神の高揚など有用に働くが、上述

した様に過剰量では有害となるために、カフェインレスコーヒーが世の中で広く求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】カフェインレスコーヒーを得るためにカフェインの生合成を人為的に抑制する目的で、キサンチン誘導体の生合成に関与する遺伝子の採取が試みられてきた。図1(Advances in Botanical Research, Vol.30, Academic Press (1999) p149より掲載)に、コーヒー属植物におけるカフェイン生合成の経路を示す。図1において、実線の矢印はカフェイン合成の主要経路を、点線の矢印はカフェイン合成のマイナーな経路を、それぞれ示す。図1の2段目に示される様に、キサントシンから7-メチルキサンチン、テオブロミンを経由してカフェインを生成する生合成経路が知られており、この経路はコーヒー属植物におけるカフェイン生合成の主要経路である。このカフェインの主要生合成経路の後半は3段階のN-メチル化反応であり、これらのN-メチル化反応はS-アデノシルメチオニン依存的な反応である事が知られている。7-メチルキサンチンからバラキサンチンを経由してカフェインを生成する経路(図1の3段目)も存在しているが、この経路の寄与は大きなものではない。7-メチルキサンチンを合成する最初のメチル化反応については、当該反応を担う酵素の遺伝子が採取され、既に報告されている(国際公開番号 WO 97/35960)。しかし、第2段階、第3段階のメチル化反応に関与する遺伝子は、まだ知られていなかった。効率的かつ確実に、カフェインの生合成経路を操作するには、カフェイン生合成に関与する酵素の遺伝子について、より多くの知見を得る必要がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らはカフェインの生合成において、テオブロミンの生合成を担っている第2段階のメチル化反応に関与する酵素に注目し、当該酵素をコードする遺伝子の採取を行った。当該酵素は7-メチルキサンチンからテオブロミンを生成する反応を触媒する酵素であるために、当該酵素の遺伝子の発現を抑制すると、テオブロミンの生合成が抑制される。カフェインの生合成経路において、テオブロミンのN-メチル化反応によりカフェインが生成するため、テオブロミンの生合成が抑制されると、カフェインの生合成もまた抑制される。上述した様に、テオブロミンとカフェインとは共にキサンチン誘導体として類似の薬理作用を有するために、テオブロミンとカフェインの両者の生合成を同時に操作できる酵素の遺伝子を採用する事には大きな意義がある。即ち、第3段階のメチル化反応に関与し、カフェインの最終的な生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を採用してその発現を抑制すると、カフェインの生合成は抑制されるがテオブロミン量は減少せず、代謝が抑制される為に逆にテオブロミンが蓄積されると考えられる。よってテオブロミンがカフェ

インと類似の薬理活性を有している事を考えると、テオブロミン合成酵素の遺伝子を採取した本発明の効果は大きいと考えられる。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1298で示される塩基配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) 由来のテオブロミン合成酵素遺伝子である。テオブロミン合成酵素は上述したように、コーヒー属植物において、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを合成する、メチル化反応を触媒する酵素である。配列表の配列番号2記載の塩基配列で示される遺伝子は、その様なテオブロミン合成酵素をコードする遺伝子である。

【0006】遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列を有する遺伝子である。また、その様な遺伝子は、配列表の配列番号1に示す遺伝子と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。また、その様な遺伝子は、ストリンジェントな条件下で、配列表の配列番号2に示す遺伝子とハイブリッドを形成する。その様な遺伝子も、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生成する、テオブロミン合成酵素の特徴を有するポリペプチドをコードする限り、本発明の範囲内である。

【0007】更に本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-378で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) 由来のテオブロミン合成酵素のポリペプチドである。配列番号1に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号1に示すアミノ酸配列において10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を有するポリペプチドである。また、その様なポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すポリペプチドと90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを合成するというテオブロミン合成酵素

の特徴を有する限り、本発明の範囲内である。尚、配列表の配列番号3、配列番号5、配列番号7に示すポリペプチドは、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) から得られ、配列表の配列番号1のアミノ酸配列と80%の相同性を有するポリペプチドである。これら3つのポリペプチドは、配列表の配列番号1と高い相同性を有しているにも関わらず、テオブロミン合成酵素活性を示さなかった。

【0008】配列表の配列番号2記載のテオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制し、テオブロミンの生成量を低下させた形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。本発明のテオブロミン合成酵素遺伝子は、上述した様にコーヒーアラビカのテオブロミン生成に関与する酵素をコードする遺伝子である。よって本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、植物においてテオブロミンの生成を抑制して、植物においてテオブロミンとカフェインの含量を低下させることが可能である。本発明のテオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制する植物としては、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*)、コーヒーカネフォラ (*Coffea canephora*)、コーヒーリベリカ (*Coffea liberica*) 及びコーヒーデウブレイ (*Coffea dewevrei*) 等のコーヒー属植物が挙げられる。

【0009】それらの植物において、本発明の遺伝子の発現を抑制する事により、テオブロミンとカフェインの生成を抑制することができる。遺伝子の発現を抑制する手段として、本発明の遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入する方法を用いることができる。アンチセンス遺伝子とは、ある遺伝子を構成しているDNAの転写産物であるmRNAと、相補的な塩基配列を発現する遺伝子である。アンチセンス遺伝子の転写産物は、本来のmRNAと相補性を有するために、アンチセンス遺伝子は翻訳段階で遺伝子発現を抑制する。この技術を利用することにより、テオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制することが可能である。

【0010】その他にも、遺伝子発現抑制の方法がいくつか知られている。目的遺伝子の遺伝子破壊により、目的遺伝子の発現を抑制する事ができる。また、植物においては、センス遺伝子を導入して過剰発現しても遺伝子干渉現象により目的遺伝子の発現が抑制される、というコサプレッション技術 (トランスウィッチ技術) が知られており、その様な方法を用いても目的遺伝子の発現を抑制することができる。また、二本鎖RNAを用いるDouble-stranded RNA interference (RNAi) 法が遺伝子発現の抑制に有効であることが、近年言われてきている (Chiu-Fen Chuanget al. PNAS (2000) vol.97, 4985-4990)。二本鎖RNAは配列特異的に遺伝子発現を抑えるということが、線虫やショウジョウバエを中心に明らかにされてきた。この様な二本鎖RNAを用いる方法がRNAi法であり、本方法が線虫やショウジョウバエのみならず、

シロイヌナズナ等の植物でも有効であることが最近示されてきている。RNAi法により遺伝子発現が抑制される機構はまだ知られていないが、本法は上記のアンチセンス法に比べて効率良く遺伝子発現を抑制することができると言われている。

【0011】ところで、カフェイン、テオブロミン等のプリンアルカロイドは、昆虫忌避作用があり、それが植物にとってのプリンアルカロイドの意義であると考えられている。そこで、本発明の遺伝子を導入してテオブロミンの生合成を促進させる事により、昆虫忌避活性を有する植物体を作製することができる。本発明の酵素が、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生合成する活性を担っていることを考えると、前述の7-メチルキサンチンを合成する酵素の遺伝子(国際公開番号 WO 97/35960)と共に本発明の遺伝子を植物に導入することは、特に有効であると思われる。7-メチルキサンチンを合成する酵素の活性が促進されると、本発明の酵素の基質が増加して、目的産物であるテオブロミンの蓄積が期待される。

【0012】形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えばpBI121等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明者らは特開2000-245485において、コーヒー属植物の胚発生カルスをアグロバクテリウムツメファシエンシスEHA101に感染させることにより、高い効率で形質転換できる方法を報告しており、特開2000-245485に記載した形質転換方法は特に有用であると思われる。

【0013】

【実施例】(PCRによる増幅) 一対のディジェネレート・オリゴヌクレオチド(Forwardプライマー, GGITGYDSIDSIGGICCAIAYAC; Reverseプライマー, ARIYKIYYRTRRAAISWICCIIGG)を、TCS1(Kato et al 2000, GenBank accession no. AB031280)と2つのシロイヌナズナの機能未知のタンパク質(Z99708及びAC008153)の間で保存された領域に基づいて合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、GC(A/S)(A/S)GPNTと、PGSF(H/Y)(G/K)(R/N)LFというアミノ酸配列に、それぞれ相当する。コーヒー・アラビカ(*Coffea arabica*)のcDNA及び上記の1組のプライマーを含む25 μ lの反応混合液中で、以下の条件下でPCRを行った。即ち、94℃で1分間反応した後、94℃で30秒間の変性反応、52℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分間の伸長反応の繰り返しを30サイクル行い、更に72℃で7分間の最終伸長反応を行うという条件で、PCRを行った。増幅された約270塩基対のcDNA断片を用

いて、cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。

【0014】(cDNAライブラリーの構築および目的cDNAのスクリーニング) コーヒー(*Coffea arabica*)の若い葉から全RNAを抽出し、oligo-dTカラム(Pharmacia)によりmRNAに精製した。ZAPII cDNA synthesis kit(Stratagene)を用いてmRNAからcDNAを合成し、 λ ZAPIIベクターへ導入し、ファージライブラリーを作製した。上記の増幅された断片をプローブにcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたポジティブブランクをランダムに35ヶ選択し、プラスミドに変換した後、物理地図および部分シーケンシングを行ったところ、これらは4つの独立したクローンに帰属することが明らかとなった。

【0015】それぞれの代表であり、もっとも全長cDNAに近いクローン#1、#6、#35および#45につき、その塩基配列を決定した。また、その塩基配列のオープンリーディングフレームによりコードされる、推定アミノ酸配列を決定した。図2に、シーケンシングを行った遺伝子配列を示す。クローン#45について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号2及び図2Dに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号32-1168であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、クローン#1について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号4及び図2Aに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号14-1171であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号3に示す。また、クローン#6について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号6及び図2Bに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号44-1201であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号5に示す。また、クローン#35について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号8及び図2Cに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号45-1163であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号7に示す。以下、クローン#45をMXMT1と、クローン#1をMTL1と、クローン#6をMTL2と、クローン#35をMTL3と、遺伝子をそれぞれ命名した。

【0016】MXMT1、MTL1、MTL2、及びMTL3がコードするアミノ酸配列のアラインメントを比較した結果を、図3に示す。その結果、これら4つの配列の相同性が非常に高い事が示された。これらのポリペプチドの機能を確認するために、対応するクローンの遺伝子を大腸菌で発現させて、酵素活性の確認を行った。

【0017】(GST融合タンパク質の発現) MTL1(クローン#1)、MTL2(クローン#6)、MTL3(クローン#35)およびMXMT1(クローン#45)のオープンリーディングフレームを含む領域をPCR(polymerase chain r

10

20

30

40

50

eaction)で増幅し、それらをpGEX 4T-2 ベクター (Pharmacia)へ適宜クローニングし、大腸菌 (JM109)を形質転換した。得られた大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地で培養後、OD600 が0.5 に達した後、終濃度が1mM になるようにIPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside)を加え、さらに16℃で6時間培養した。大腸菌を超音波破碎し、グルタチオン・セファロース4Bを用いてGST (glutathione S-transferase) 融合タンパク質として精製した。タンパク質濃度はBradford法により測定した。各GST 融合タンパク質 (500 ng)をSDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分離した後にCBB (クマシーブリリアンドブルー)染色をおこない、精製されたことを確認した。得られたGST 融合タンパク質につき、SDS-PAGEにより純度を解析した結果を図4に示す。図4において、レーン1はMTL2由来の融合蛋白質を、レーン2はMTL3由来の融合蛋白質を、レーン3はMXMT1 由来の融合蛋白質をそれぞれ示す。その結果、得られた3つの融合蛋白質はほぼ純粋であることが示された。

【0018】(薄層クロマトグラフによる酵素活性の測定)薄層クロマトグラフ (TLC)により、酵素活性の測定を行った。加藤ら (Plant Physiol., 1996, 98, 629-636)の方法に基づき、酵素活性の測定を行った。具体的には100 μ l の反応液 (100 mM Tris-HCl (pH7.5)、200 μ M の基質 (キサンチン、7-メチルキサンチン、テオブロミン、パラキサンチン、テオフォリン)、4 μ M 14 C 標識S-アデノシルメチオニン、200 μ M MgCl₂、200 ng GST融合タンパク質)を27℃で2時間反応後、1 mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセンレーターでクロロホルムをとばした。5 μ l の50% メタノールに溶解後、TLCで展開した (展開溶媒は水: 酢酸: n-ブタノール=2:1:4、v/v/v)。展開後、画像解析装置 (FujiBAS2000)で放射能シグナルを検出した。キサンチン (X)、7-メチルキサンチン (7-Mx)、テオブロミン (Tb)、パラキサンチン (Px)、テオフォリン (Tp)を基質として、MTL2、MTL3及びMXMT1 由来の融合蛋白質の酵素活性を測定した結果を、図5に示す。図5よりMXMT1 由来の融合蛋白質は、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを合成する強力な活性を有していた。MXMT1 由来の融合蛋白質は、パラキサンチンを基質としてカフェインを合成する活性も有していたが、その相対活性は前述の活性の15%であった。一方、MTL2及びMTL3由来の融合蛋白質は、上記の化合物を基質として用いてメチル基転移活性を示すことはなかった。

*【0019】(高速液体クロマトグラフによる酵素活性の測定と生産物の同定)高速液体クロマトグラフ (HPLC)により、MXMT1 の融合蛋白質の酵素活性の測定と、酵素反応による酵素反応生産物の同定を行った。100 μ l の反応液 (100mM Tris-HCl (pH7.5)、200 μ M の基質 (7-メチルキサンチン、パラキサンチン、テオブロミン)、50 μ M S-アデノシルメチオニン、200 μ M MgCl₂、200ng GST融合タンパク質)を27℃で2時間インキュベート後、1 mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセンレーターでクロロホルムをとばした。50 μ l の12% アセトニトリルに溶解後、UV検出系を備えたHPLC (Shodex RSpak DS-613 column)で分画した。展開溶媒は12%のアセトニトリルを用い、A₂₅₄でシグナルを検出した。

【0020】その結果を、図6に示す。図6Aは、MXMT1 の融合蛋白質を、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンを基質と反応させ、その反応産物をHPLCで解析したチャートである。図6Bは、標品としてテオブロミンをHPLCで解析したチャートである。図6Cは、ネガティブコントロールとして、MXMT1 の融合蛋白質、S-アデノシルメチオニン、7-メチルキサンチンを混合した後にすぐに反応を止め、その混合液をHPLCで解析したチャートである。図6Dは、標品として、7-メチルキサンチン、テオブロミン、パラキサンチン、カフェインをHPLCで解析したチャートである。図6Eは、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンをMXMT1 の融合蛋白質と反応させた反応液に、テオブロミンを添加してHPLCで解析したチャートである。図6Aで検出された反応生成物のピーク位置は、標品として加えたテオブロミンの位置と一致し、また酵素反応液にテオブロミンを添加しても1つのピークしか検出されなかったことから、MXMT1 の融合蛋白質の酵素反応により、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンが生成する事が示された。

【0021】

【発明の効果】本発明により、コーヒーアラビカにおけるテオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子が与えられた。テオブロミン合成酵素はカフェインの生合成に関与する酵素であり、当該酵素の遺伝子発現を抑制した形質転換植物を作製することにより、カフェインレスコーヒーを得ることができ。

【0022】

【配列表】

*

<110>出願人氏名: 奈良先端化学技術大学院大学長

<120>発明の名称: コーヒー属植物のテオブロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

<160>配列の数: 8

<210>配列番号: 1

9

<211>配列の長さ: 378

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

MELQEVLMHN EGEQDTSYAK NASYNLALAK VKPFLEQCIR ELIRANLPNI NKCIKVADLG 60
CASGPNTLLT VRDIVQSIDK VGQEEKNELE RPTIQIFLND LFQNDFNSVF KLLPSFYRKL 120
EKENGRKIGS CLISAMPGSF YGRLFPEESH HFLHSCYSVH WLSQVPSGLV IELGIGANKG 180
SIYSSKGCRP PVQKAYLDQF TKDFTTFLRI HSKELFSRGR MLTCICKVD EFDEPNPLDL 240
LDMAINDLIV EGLLEEKLD SFNIPFFTPS ABEVKCIVEE EGSCEILYLE TFKAHYDAAF 300
SIDDDYPVRS HEQIKAERYA SLIRSVYEPI LASHFGEAIM PDLFHLAKH AAKVLHMGKG 360
CYNLIISLA KKPEKSDV 378

```

<210>配列番号: 2

<211>配列の長さ: 1298

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

AGCAGTCGCA ATTCGATTGT CCTGCATATG AATGGAGCTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA 60
TGAAGGTGAA GCGCATACAA GCTACGCCAA GAATGCATCC TACAATCTGG CTCTTGCCAA 120
GGTGAAACCT TTCCTTGAA C AATGCATACG AGAATTGTG CGGGCCAAC T GCCCAACAT 180
CAACAAGTGC ATTAAAGTTG CGGATTGGG ATGCGCTTCT GGACCAAACA CACTTTTAAC 240
AGTGGGGAC ATTGTGCAAA GTATTGACAA AGTTGGCCAG GAAGAGAAGA ATGAATTAGA 300
ACGTCCACC ATTGAGATT TTCTGAATGA TCTTTCCAA AATGATTTC ATTGCGTTT 360
CAAGTTGCTG CCAAGCTTCT ACGCAAAC T CGAGAAAGAA AATGGACGCA AGATAGGATC 420
GTGCCTAATA AGCGCAATGC CTGGCTCTT CTACGGCAGA CTCTCCCG AGGAGTCCAT 480
GCATTTTTTG CACTCTTGT ACAGTGTCA TTGGTTATCT CAGGTTCCCA GGGTTTGGT 540
GATTGAATTG GGGATTGGTG CAAACAAAG GAGTATTAC TCTTCAAAG GATGTCGTCC 600
GCCGTCAG AAGGCATATT TGGATCAATT TACGAAAGAT TTTACCACAT TTCTAAGGAT 660
TCATTGAAA GAGTTGTTT CAOTGGCGG AATGCTCCT ACCTGCATT GTAAAGTAGA 720
TGAATTGAC GAACCGAATC CCCTAGACTT ACTTGACATG GCAATAAAG ACTTGATTGT 780
TGAGGGACTT CTGGAGGAAG AAAAATTGGA TAGTTTCAAT ATTCCATTCT TTACACCTTC 840
AGCAGAAGAA GTAAAGTGCA TAGTTGAGGA GGAAGGTTCT TGGAAATTT TATATCTGGA 900
GACTTTTAAG GCCCATTATG ATGCTGCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC 960
CCATGAACAA ATTAAAGCAG AGTATGTGGC ATCATTAATT AGATCAGTT ACGAACCCAT 1020
CCTCGCAAGT CATTTGGAG AAGCTATTAT GCTGACTTA TTCCACAGGC TTGCGAAGCA 1080
TGCAGCAAAG GTTCTCCACA TGGGCAAAG CTGCTATAAT AATCTTATCA TTTCTCTCGC 1140
CAAAAAGCCA GAGAAGTCAG ACGGTAAAA GTTTGTTTT AGTTGTTTT TGTGCGTTG 1200
GGGTCCTTC GGGTATTGTC GTTTGTATT CGTAATAAAA GTGATGTGCA AGAATAAGAT 1260
ATTTAGTACA ATATTTTCAT AAAAAAAAA AAAAAAAAA 1298

```

<210>配列番号: 3

<211>配列の長さ: 385

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

MELQEVLMHN GGEQASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV RELIRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVWDTVQSID KVKQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQNDFNSV FMLPSFYRK 120
LEKENGRKIG SCLIAAMPGS FHGRLFPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180

```

11

RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR MRSEELLSRG RMLLTCLCKG DECDGPNTMD 240
 LLEMAINDLV AEGRLGEEKL DSFNPPIYA SVEEVKOWE EEGSFEILYL QTFKLRYDAG 300
 FSIDDDQVR SHSPVYSDEH ARAAHVASLI RSVYEPILAS HFGEAIIPDI FHRFATNAAK 360
 VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385

<210>配列番号: 4

<211>配列の長さ: 1360

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGAAGC 60
 AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT 120
 TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTCGGGGC CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCAATTA 180
 AGTTGCAGAT TTGGGATGCG CTTCCGGACC AAACACACTT TTAACCGTTT GGGACACTGT 240
 ACAANGTATT GACAAAGTTA AGCAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA 300
 GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA TTTCAATTGG GTTTTCATGC TGCTGCCAAG 360
 CTCTACCGC AAACCTGAGA AAGAAAATGG ACGCAAAATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC 420
 AATGCCTGGC TCCTTCCAGC GCAGACTCTT CCGCAGGAG TCCATGCATT TTTTACACTC 480
 TTCTTACAGT CTTAGTTTTT TATCCAGGT TCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT 540
 CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTC CAAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGGC 600
 ATATTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC CACATTTTGA AGGATGCGTT CGGAAGAGTT 660
 GCTTTCAGT GCGGAATGC TCCTTACTTG CATTTGTAAA GGAGATGAAT GCGACGGCCC 720
 GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGCTGAGG GACGTCTGGG 780
 GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA 840
 GTGCATGGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCCG 900
 TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATCCCAT TCCAGTATA 960
 CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT GGCATCATT ATTAGATCAG TTTACGAACC 1020
 CATCTAGCA AGTCATTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCACA GGTTCGAC 1080
 GAATGCAGCA AAGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTCTCT 1140
 TGCCAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTTGT TTAGTGGT TTTGTGTGA 1200
 TGGGTGTTT TCTGATACG GGAAGGATT CAGTCCGTT GGGGTCTAT CCGAGTATT 1260
 TACTTTTAT ATTATTAGT GGTGTATAAT TATTATGTTA CATGTGTTA TTGTAATAA 1320
 AAGTGACGTA CAAAAATAA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA 1360

<210>配列番号: 5

<211>配列の長さ: 385

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

MELQEVLMN GGEGDASYAK NSSFNQLVLA KYKPVLEQCV GELLRANLPN INKCIKVADL 60
 GCASGPNTLL TVRDIQSID KVRQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQDNFNSV FMLLPSFYRK 120
 LEKENGRTIG SCLIAAMPQS FHGRLPPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
 RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IRSEELLSRG RMLLTCLCKG DEFDPNTMD 240
 LLEMAINDLV VEGHLEEKL DSFNPPIYAA SVEELKCIVE EEGSFEILYL ETFLRYDAG 300
 FSIDDDQVR SHSPEYSDEH ARAAHVASLL RSVYEPILAN HFGEAIIPDI FHRFATNAAK 360
 VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385

13

<210>配列番号: 6

<211>配列の長さ: 1304

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

TTTAGCAGTC CCAATTCGAT TTATGTACAA GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT   60
CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGOGATGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA   120
ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTGCGGGC   180
CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA AGTTGCGGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC   240
AAACACACTT TTAACAGTTC GGGACATTGT ACAAAGTATT GACAAAGTTA GGCAAGAAAT   300
GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA GGTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA   360
TTTCAATTGG GTTTTCATGT TGCTGCCAAG TTTCTACCGC AAACCTGAGA AAGAAAATGG   420
AGCAAGATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC AATGCCTGGC TCTTCCACG GCAGACTCTT   480
CCCGAGGAG TCAATGCATT TTTTACACTC TTCTTACAGT CTTCAATTTT TATCCAGGT   540
TOCCAGGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC   600
CAAAGCAAGT CCTCGCCCG TCCAGAAGGC ATATTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC   660
CACATTTTGA AGGATTGCTT CGGAAGAGTT GCTTTCACGC GGCCGAATGC TCCTTACTTG   720
CATTTGCAAA GGAGATGAAT TCGACGGCCC GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT   780
AAAGACTTGG GTTGTGAGG GACATCTGGA GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC   840
AATCTATGCA GCTTCAGTAG AAGAATTAAA GTGCATAGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA   900
AATTTGTGAC TTGGAGACTT TTAAGCTCCG TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA   960
TTGCCAAGTA AGATCCCAT TCCCAGAATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT  1020
GGCATCATTA CTTAGATCAG TTTACGAACC CATCCTGCA AATCATTTTG GAGAAGCTAT  1080
TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTTGCGAC GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA  1140
AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA  1200
AAAGCTTGT TATAGTTGGT TTTTGTGCTA TGGTTTGT TCTGATACGG GGAAAGGATT  1260
TAGTGGCGTT GGGTTTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA                               1304

```

<210>配列番号: 7

<211>配列の長さ: 372

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

MELQEVLRMN GGEQTSYAK NSAYNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL   60
GCASGPNTLL TVRDIVQSID KVGQEKKNEL ERPTIQIFLN DLFNDFNSV FKLLPSFYRK   120
LEKENGRIKIG SCLIGAMPQS FYSRLFPEES MHFLHSCYCL QWLSQVPSGL VTELGI STNK   180
GSIYSSKASR LPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IHSEELFSHG RMLLTCTCKG VELDARNAID  240
LLEMAINDLV VEGHLEEKL DSFNLVYIP SAEVVKCIVE EGSFEILYL ETFKVLVDAG   300
FSIDDEHIKA EYVASSVRV YEPILASHFG EAIIPDIFHR FAKHAAKVLP LGKGFYNNLI   360
ISLAKKPEKS DV                               372

```

<210>配列番号: 8

<211>配列の長さ: 1316

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

CTTTGGCAGT CCCAATTGTA TTTATGTACA AGTCCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG   60
TCCTGCGGAT GAATGGAGGC GAAGGCGATA CAAGCTACGC CAAGAATTCA GCCTACAATC  120

```


15

16

```

AACTGGTCT CGCCAAGGTG AAACCTGTCC TTGAACAATG CGTACGGGAA TTGTTGGGG 180
CCAACCTGCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGGGGA TTTGGGATGC GCTTCTGGAC 240
CAAACACACT TTTAACAGTT CGGGACATTG TCCAAAGTAT TGACAAAGTT GGCCAGGAAA 300
AGAAGAATGA ATTAGAACGT CCCACCATTG AGATTTTCTT GAATGATCTT TTCCCAAATG 360
ATTTCAATTC GGTTTTCAAG TTGCTGCCAA GCTTCTACCG CAAACTTGAG AAAGAAAATG 420
GACGCAAAAT AGGATGTGTC CTAATAGGGG CAATGCCCGG CTCTTTCTAC AGCAGACTCT 480
TCCCGAGGA GTCCATGCAT TTTTACACT CTGTACTG TCCTCAATGG TTATCTCAGG 540
TTCCTAGCGG TTTGGTGACT GAATGGGGA TCAGTACGAA CAAAGGGAGC ATTTACTCTT 600
CCAAAGCAAG TCGTCTGCC GTCCAGAAGG CATATTTGGA TCAATTTACG AAAGATTTTA 660
CCACATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAGT TGTTCACAG TGGCCGAATG CTCCTTACTT 720
GCATTTGTAA AGGAGTTGAA TTAGACGCC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA 780
TAAACGACTT GGTGTTGAG GGACATCTGG AGGAAGAAAA ATTGGATAGT TTCAATCTTC 840
CAGTCTATAT ACCTTCAGCA GAAGAAGTAA AGTGCATAGT TGAGGAGGAA GGTCTTTTG 900
AAATTTTATA CCTGGAGACT TTTAAGGTCC TTTACGATGC TGGCTTCTCT ATTGACGATG 960
AACATATTAA AGCAGAGTAT GTTGCATCTT CGTTAGAGC AGTTTACGAA CCCATCCTCG 1020
CAAGTCATTT TGGAGAAGCT ATTATACCTG ACATATTCCA CAGGTTTGGG AAGCATGCAG 1080
CAAAGTTCT CCCCTTGGG AAAGGCTTCT ATAATAATCT TATCATTCTT CTCGCCAAAA 1140
AGCCAGAGAA GTCAGACGTG TAAAGTTTG TTTTGTGTT GGGGAAAGGA ATAAGTGCCG 1200
TTGGGGTCT TCGGTATT GTGCTTTTA TATTATAFTG TTTGTATCC GTAATAAAG 1260
TGGTGTGTAA GAATAAGATA TTTGACATAT ATTATTTCA AAAAAAAAA AAAAAA 1316

```

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、カフェイン生成の経路を示す図である。

【図2】図2は、MTL1、MTL2、MTL3及びMXMT1より得たcDNAの塩基配列を示す図である。

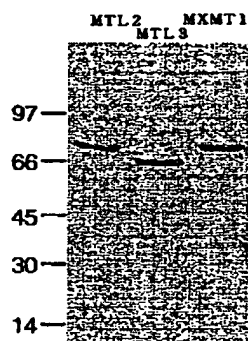
【図3】図3は、MXMT1、MTL2及びMTL3より得たアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

* 【図4】図4は、MTL2、MTL3及びMXMT1より得た融合蛋白質をSDS-PAGEで解析した結果を示す写真である。

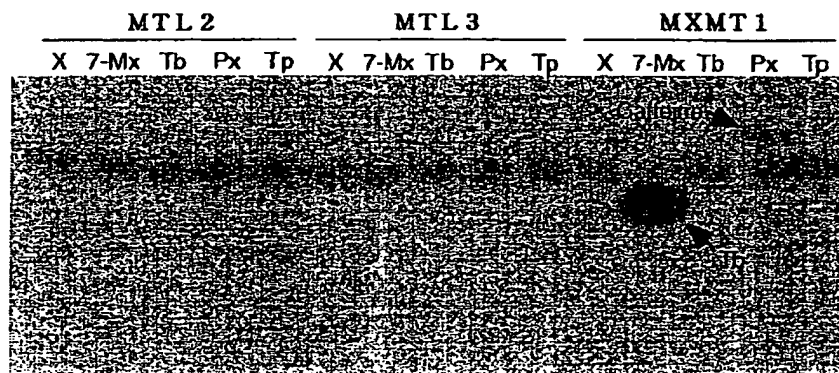
【図5】図5は、MTL2、MTL3及びMXMT1より得た融合蛋白質の酵素活性を、TLCで解析した結果を示す写真である。

【図6】図6は、MXMT1より得た融合蛋白質の酵素反応生成物をHPLCで同定した結果を示すチャートである。

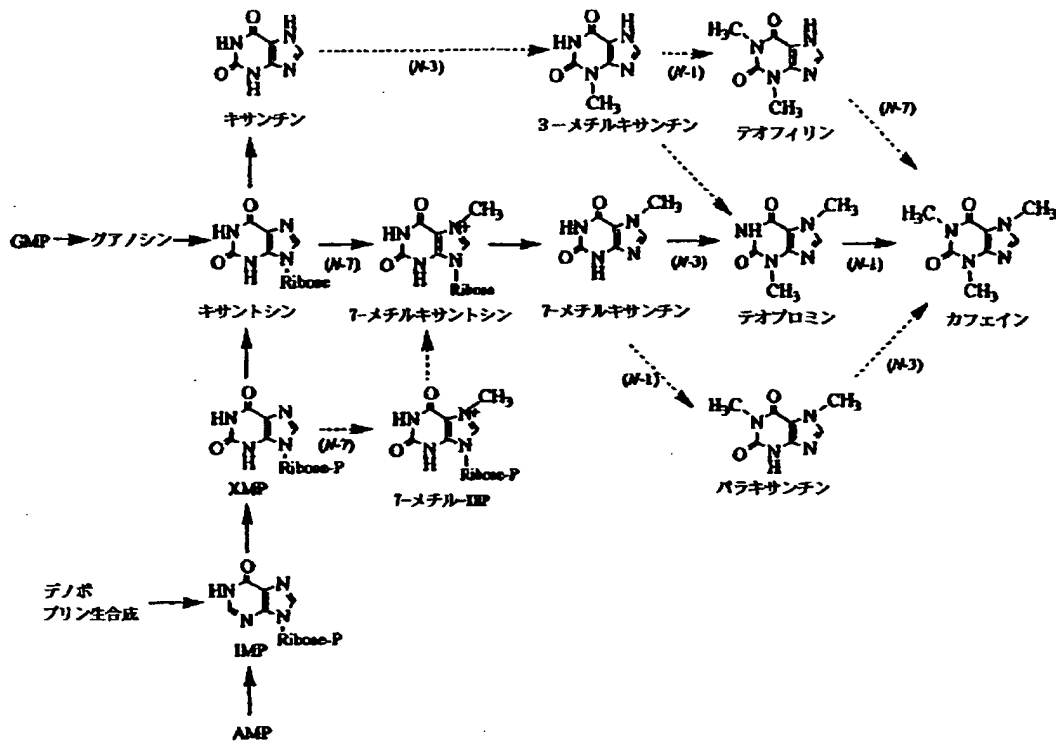
【図4】



【図5】



【図1】



【図2】

[illegible][illegible]

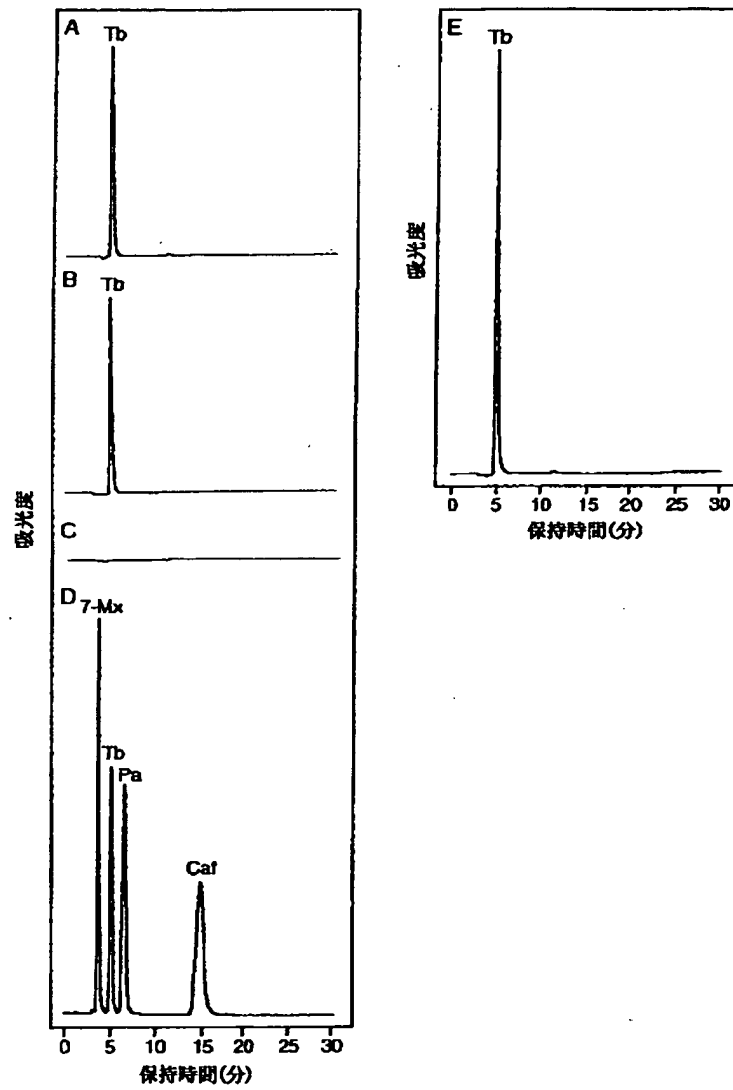
C	CTTTCGGGCT	CCCAATTATCA	TTTATATACA	ATCTCTCCAT	ATGATTCGAG	TTCTCCGGAT	GAATGGAGGC	GAGGCGGATA	980
	CACACTACCC	CAGATTAATCA	TCCATCAATC	ACTGCTGCT	CCGACGATCT	TTGACAACTT	CATGACAGCA	TTGTTCCGGG	981
	CCAACTCTGC	CACATCTACC	ATGACATCTA	ATGATTCGGA	CTCTCTTGAC	CCAAACATCT	TTTACATGCT	CCGGACATCT	982
	TCGAAATGCT	TGCACAGATT	GGGZGAGAAA	AAGAGAGATA	TTTATGACGT	CCCAACTCTC	AGATTTTTCT	TCGATGATCT	983
	GGTTTTCAGT	TTGCTGAGAT	GGCTTGACGA	CAGACTTGAC	AAGAGAAATG	AGCCCAAAAT	AGATCTATCT	CTAATAGGAG	984
	CAATGCTGCG	CTCTTTTCAG	TTCCGCGAGA	GTCTCTACAG	TTTTTACACT	CTGTCTTACG	CTGCTTACAG	TTATCTACAG	985
	CTCTTAGCGC	TTTGGTCACT	ATGATCGGGA	CAGAGGAGAG	ATTACTCTCT	CCAGAGAGAG	TTGTCGAGCG	GTTCGACGAG	986
	CATTNTTTCG	TCAAATTTAG	AAGATTTTAT	CCCAATTTCT	AGGAACTATCT	TCGAGAGATG	TTGTTTTCAC	TTGGCTGATC	987
	AGCTTTGTAT	AGGCTTTTGA	TTCATGTCCT	GGAAATCTAT	AGCAATTTCT	CCAGAGCGAA	TAAAGCACTT	CTGCTTGTCG	988
	AGGAGAGAAA	ATTGGATAGT	TTTAACTTCT	CAGCTATCTC	AGCTCTCAGA	GAGAGATTTA	AGGCTCATAT	TCAGAGAGTA	989
	AAGATTTTAT	CTCGAGACTT	TTTAAAGTCT	TTTACAGATC	TGGCTCTTCT	ATTGACGATCT	ACCAATTTAA	CTGTGATCTT	990
	CCGTTAGAGC	ATTTCAGTGA	CCCACTCTAT	CAGCTCAATT	TGGAGAGAGT	ATTATACACT	ACATATTTCA	CAGATCTGAT	991
	CGCTTATGCT	CGCTCTTGGG	AAGAGCTCTG	ATAATATCT	TATATCTTCT	CTGCGCCAAA	AGCCGAGAAA	TCAGTACGCT	992
	TTTGTGTGCT	GGGAGAGAGA	ATAGGCTGCT	TGGGGGCTCT	TTGCGGAGAT	GTGCTTTATG	TTTGTGATCT	GAATAAGAGG	993
	TGCTGTGAAA	CAGATGAGTA	TTTGCATAT	ATTATTTTAT	AAAAAAGAAA	AAAAAA			1259

[illegible]

【図3】

MXMT1	MSIQEVLHANECCGTSVAKNSYN-LALAKVKHFLQCTREIRANLEN	49
MTL1G::EA::...S:P:Q:V::...V::V::.....	50
MTL2G::A::...S:P:Q:V::...V::VG::.....	50
MTL3R::G::.....SA::Q:V::...V::V::.....	50
MXMT1	INICIKWALGCASGNTLTVKCTVQSHNGQEPFWELEKPTIQIFIN	99
MTL1:W:T::...:K::M::.....V::T	100
MTL2:R::M::.....V::T	100
MTL3:K::.....	100
MXMT1	DIQFQENSVPKLLPSFYKLEKNGKIGSCILSNMPCSFYGLPPEES	149
MTL1:M::.....:A::...:H::.....	150
MTL2:M::.....:A::...:H::.....	150
MTL3	...P::.....:S::.....	150
MXMT1	MHFLHSCYSVHNLQVESCIVTELGCANMCSYSSROCRPPUQKAYLDQ	199
MTL1S::IQF::.....T::T::R::...ASP::.....	200
MTL2S::IQF::.....T::T::R::...ASP::.....	200
MTL3CLQ::.....T::ST::.....AS:L::.....	200
MXMT1	PIKOPTIFLIRKSEKLSFGMLTCTCKVDFDEPNPDLIDAINLI	249
MTL1MR:E::L::.....:G::C:G::TM::E::...V	250
MTL2R:E::L::.....:G::C::TM::E::...V	250
MTL3E::H::.....GE:L:AR:AI::E::...V	250
MXMT1	VEGLLEKELDSPNTHFFIPSAEEVKCTVEEGSCILLVLETPGHYDA	299
MTL1	A::R:G::...V:IY:A:V::...M::...F::...Q::IR::G	300
MTL2	...H::...V:IYAA:V::L::...F::...IR::G	300
MTL3	...H::...L:VYL::...F::...VL::G	300
MXMT1	FSHDDYPVASH-----EQIQAEVVASLIRSVETILASHGEADMDL	343
MTL1CQ::...SVYSD:EAR:AH::.....L::I	350
MTL2CQ::...SVYSD:EAR:AH::...L::...N::...I::I	350
MTL3EH-----:SV:A::.....I::I	337
MXMT1	FHRLAKHAKVIMERGCONLIISLAKPERSDV	378
MTL1	...F:TN::...IRL::F::.....I	385
MTL2	...F:TN::...IRL::F::.....I	385
MTL3	...F::...FL::F::.....	372

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

データ(参考)

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(C 1 2 N 9/00

5/00

C

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)

Fターム(参考) 2B030 AB03 AD08 CA14
4B024 AA05 AA08 BA07 BA79 CA04
CA07 CA09 CA20 DA02 DA06
EA04 GA11 GA19 HA03 HA13
HA14
4B050 CC01 CC03 DD13 EE01 FF14E
LL02 LL05
4B065 AA26X AA88X AA88Y AB01
AC14 AC20 BA02 BB01 BC03
BD01 BD14 CA27 CA41 CA53